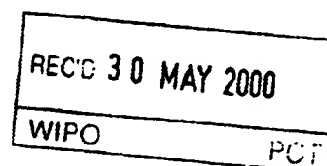


**MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO**  
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per .....

N. MIPB A. 000652



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

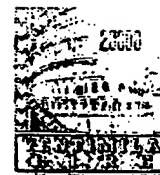
**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li 20 APR 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

*Giulio Romani*

POTREP 00 / 0 26 18



170397107

MINISTERO DELL'INTERNO  
DIREZIONE REGIONALE DEL REGISTRO  
REGIONE LOMBARDA

RICHIEDENTE

SITAR GIAMMARIA  
CERTOSA DI PAVIA (PV)

PF

STHGM47R14H501E

E. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

Dr. Diego Pallini ed altri

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

C.so di Porta Vittoria

9

Milano

20122

MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

C. TITOLO

C12N

5 00

Procedimento per isolare cellule fetali presenti nel sangue periferico materno.

ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO:

SI NO

SE INSTANZA DATA

R. PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

esigete nome

esigete nome

Sitar Giammaria

F. PRIORITA'

esigete di organizzazione

esigete di servizio

esigete di servizio

esigete di servizio

esigete di servizio

PERGIMENTO RISERVE

esigete di servizio

esigete di servizio

Nessuna

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

Nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

Doc. 1. 2 19  
Doc. 2. 2 01  
Doc. 3. 1  
Doc. 4. 0  
Doc. 5. 0  
Doc. 6. 0  
Doc. 7. 0

1. modulo con disegni schematici, descrizione e invenzione, disegni, fotografie, etc.  
2. modulo con disegni schematici, descrizione e invenzione, disegni, fotografie, etc.  
3. modulo con disegni schematici, descrizione e invenzione, disegni, fotografie, etc.  
4. modulo con disegni schematici, descrizione e invenzione, disegni, fotografie, etc.  
5. modulo con disegni schematici, descrizione e invenzione, disegni, fotografie, etc.  
6. modulo con disegni schematici, descrizione e invenzione, disegni, fotografie, etc.  
7. modulo con disegni schematici, descrizione e invenzione, disegni, fotografie, etc.

SCOLGIMENTO RISERVE

esigete di servizio

esigete di servizio

E. PRESSIONE DI VERSAMENTO (esigete nome)

Trecentosessantacinquemila.=

esigete di servizio

COMPILATO IL 30 03 1999

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Diego Pallini

CONTINUA SI/NO

NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

MILANO

15

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI99A-000652

Reg. A

UFFICIO RICEVIMENTO

NOVANTANOVE

TRENTA

esigete di servizio

MARZO

UFFICIO RICEVIMENTO

NUMERO DI DOMANDA

MI99A-000652

00

esigete di servizio

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

M199A 000652

30-03-1999

Procedimento per isolare cellule fetali presenti nel sangue periferico materno.

L. RIASSUNTO

Procedimento per isolare cellule embrionali presenti nel sangue periferico materno tramite modifica della densità delle cellule ematiche e separazione a mezzo di centrifugazione in gradiente di densità discontinuo.

BEST AVAILABLE COPY



M. DISEGNO

"Procedimento per isolare cellule fetali presenti nel sangue periferico materno"

residente in: CERTOSA DI PAVIA (PV)

Depositata il \_\_\_\_\_ con il n° \_\_\_\_\_

★ ★ ★ ★ ★

La presente invenzione è relativa ad un procedimento per isolare cellule fetali presenti nel sangue periferico materno attraverso modifica della densità delle cellule ematiche e separazione a mezzo di centrifugazione in gradiente di densità discontinuo.

Uno degli scopi della moderna genetica medica risiede nello sviluppo di test diagnostici affidabili e, in particolare in campo prenatale, sicuri e che non costituiscano un rischio per la sopravvivenza del feto e della madre (anche se rarissimi, sono stati descritti casi di peritonite mortale a seguito di amniocentesi).

a) un test non invasivo chiamato "Triplo test", molto costoso e rimborsato dal servizio sanitario nazionale solo nei casi a rischio (vale a dire per donne al di sopra dei 36 anni o nel caso in cui i genitori presentino nell'anamnesi familiare malattie genetiche ereditarie); questo test ha un indice di affidabilità scarso, essendo rari i falsi negativi, ma numerosi i

falsi positivi.

b) due test invasivi, che vengono proposti nel caso di positività al "Triplo test o attuati indipendentemente da esso;

- amniocentesi: è eseguibile solo dopo la 14<sup>a</sup> settimana; il rischio di decesso per il feto è dello 0,5-2% (dato dell'Organizzazione Mondiale della Sanità); è molto costoso;

- esame dei villi coriali: eseguibile solo dopo la 10<sup>a</sup> settimana; il rischio di decesso per il feto è dello 0,5-5% (dato dell'Organizzazione Mondiale della Sanità).

Attualmente si effettuano ogni anno in Europa più di due milioni di test per la ricerca di comuni alterazioni cromosomiche. Alle donne gravide di 36 anni o più si propone solitamente l'amniocentesi o l'esame dei villi coriali con successivo kariogramma.

Uno dei potenziali approcci non invasivi per ottenere materiale utile alla diagnosi genetica del nascituro consiste nell'analisi di materiale cellulare fetale presente nel torrente circolatorio materno.

Dal 1989 la cosiddetta polymerase chain reaction (da qui in poi PCR) è stata impiegata con successo per ricercare DNA fetale nel torrente circolatorio materno. In questo studio la PCR è stata usata per cercare bersagli Y altamente ripetitivi sul sito DYZ1 nel DNA di sangue periferico di 19 gestanti. Tutte e 12 le gestanti che avevano fornito campioni positivi a Y hanno poi dato alla luce maschi, mentre tutte e 7 le gestanti che avevano fornito campioni negativi hanno avuto femmine.

La tecnica di amplificazione delle sequenze cromosomiali fetali Y provenienti da sangue materno è stata avvalorata da un certo numero di stu-

di. In tutti i gruppi esaminati il DNA cromosomiale fetale Y è stato rilevato tramite PCR in sangue periferico materno che non era stato precedentemente arricchito con cellule fetali, già a far tempo dalla 7<sup>a</sup>-8<sup>a</sup> settimana di gestazione (Simpson J.L. e Sherman E., Ann. N.Y. Acad. Sci., 731:1-262, 1993).

Questi studi hanno pertanto fornito prove conclusive circa il fatto che cellule fetali sono sempre presenti nel sangue periferico materno. Parimenti si può dire delle cellule embrionali, col qual termine si intendono cellule di feto allo stadio primitivo, vale a dire antecedente alla 14<sup>a</sup> settimana.

E' il caso di sottolineare che la letteratura internazionale usa il termine "cellule fetali" per indicare sia le cellule pre-fetali (embrionali) che fetali vere e proprie.

La cellula fetale che si presta con maggiori probabilità ad essere isolata ai fini dell'indagine genetica è l'eritroblasto (ER), che costituisce una porzione significativa delle cellule ematiche nel sangue fetale, mentre è eccezionalmente raro nel sangue periferico dell'adulto. Di fatto gli eritroblasti circolanti costituiscono circa il 10% dei globuli rossi nel feto di 11 settimane e lo 0,5% in quello di 19 settimane, andamento che indica chiaramente la sua preponderanza nei primissimi mesi di vita.

Per quanto riguarda i globuli bianchi embrionali embrionali, essi non sono prodotti in quantità significative durante il primo trimestre di gestazione, pertanto è altamente improbabile reperirle nel torrente circolatorio materno durante il periodo iniziale della gravidanza.

Un altro tipo cellulare che può costituire un'interessante candidato per l'indagine citogenetica è costituito dalle cellule staminali.

Un problema fondamentale è dato dalla quantità di cellule fetali recuperabili da 20 ml di sangue materno, che devono essere almeno una ventina per poter effettuare la diagnosi genetica. Secondo i dati forniti dalla letteratura medica internazionale, in 20 ml di sangue materno periferico ci sono poche centinaia di cellule fetali frammiste a circa 120-150 milioni di altre cellule nucleate, un numero eccezionalmente basso, soprattutto in considerazione del fatto che ciascuna fase di manipolazione in laboratorio produce perdite anche consistenti di materiale cellulare. Pertanto è necessario sviluppare un metodo secondo il quale le manipolazioni in laboratorio producano una perdita minima di materiale cellulare, al fine di ottenere, dopo l'isolamento, quel minimo di 20-25 cellule fetali per un'accurata analisi citogenetica.

Di solito i metodi di separazione cellulare impiegati per isolare le cellule fetali dal sangue materno impiegano sia strumenti molto semplici (provette e centrifuga) che procedure tecnicamente molto impegnative come l'elutriazione centrifuga, fluorescence activated cell sorter o charge flow separation.

La separazione cellulare in gradienti di densità preparati in comuni provette da centrifuga genera un'enorme perdita di materiale cellulare (solitamente del 50%) ed ha un'accuratezza insufficiente dal momento che si tratta di una procedura manuale. D'altro canto, i metodi che usano tecnologie sofisticate, oltre ad essere costosi, necessitano operatori con una specifica preparazione e richiedono tempi lunghi ("Cell separation: methods and selected applications", ed.: Pretlow T.G. and Pretlow T.P., New York, Academic Press, 1982).

Nel caso degli eritroblasti, alle difficoltà sopra dette si aggiunge il fatto che il profilo di distribuzione di densità degli queste cellule si sovrappone con quello di linfociti e monociti, come illustrato dalla Tabella 1 (Haematologica, Gen.-Feb. 1997), rendendo impossibile la loro separazione attraverso metodi di centrifugazione in gradiente di densità.

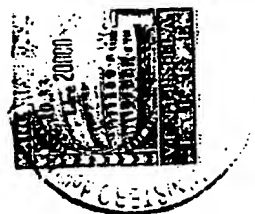


Tabella 1

Tipo di cellula	Densità cellulare (g/ml)
linfocita	1,054-1,077
eritroblasta	1,065-1,093
monocita	1,058-1,064

#### SOMMARIO DELL'INVENZIONE

E' stato ora sorprendentemente scoperto un procedimento rapido, semplice, economico ed affidabile per isolare cellule embrionali presenti nel sangue periferico materno, procedimento atto a consentire un'analisi genetica non invasiva e pertanto priva di rischi per il feto, oltre che di disagi per la madre.

Pertanto la presente invenzione si riferisce ad un procedimento per isolare le cellule fetali presenti nel sangue materno periferico, procedimento che comprende le seguenti fasi:

- il sangue periferico materno viene aggiunto ad un mezzo coltura tissutale non fisiologico;
- vi si aggiunge una soluzione di acido citrico, sodio citrato e destrosio;
- il sangue proveniente dalle fasi a) e b) viene introdotto in un adatto apparecchio separatore nel quale viene successivamente introdotta una soluzione di densità maggiore contenente un aggregante eritrocitario;



- d) le cellule nucleate aventi una prestabilita densità vengono isolate tramite una singola centrifugazione in gradiente di densità discontinuo;
- e) le cellule nucleate vengono lavate con un mezzo da coltura tissutale e risospese in mezzo di coltura appropriato;
- f) le cellule fetali vengono individuate quantitativamente e qualitativamente tramite adatti sistemi di riconoscimento.

#### BREVE DESCRIZIONE DELLA FIGURA

In Figura 1 è rappresentato l'apparecchio di separazione cellulare già descritto nella domanda di brevetto italiana MI97A002457 (a nome del richiedente) utile all'isolamento delle cellule embrionali tramite gradiente di densità. Questo apparecchio consiste in una camera allungata (1) la cui sezione trasversale decresce dalla base verso la sommità dell'apparecchio, camera nella quale sfocia almeno un primo canale (2). Uno dei termini di questo primo canale (2) si apre all'interno di detta camera in corrispondenza della base, e l'altro termine è collegabile ad una fonte di liquido pressurizzabile (non illustrato). Nella camera (1) sfocia uno dei termini di un secondo canale (3) in corrispondenza della sommità. Inoltre in detta camera (1) sfocia almeno un canale addizionale (4), uno dei termini del quale si apre sulla parete allungata della camera (1), e l'altro termine sbocca all'esterno dell'apparecchio.

#### DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Oggetto della presente invenzione è un procedimento che consente di isolare cellule fetali dalle altre cellule nucleate presenti nel sangue materno, in particolare da linfociti e monociti.

Tra le cellule fetali che vengono isolate tramite il procedimento della pre-

sente invenzione, gli eritroblasti fetali sono i preferiti.

Questo procedimento si attua tramite modifica della densità delle cellule nucleate presenti nel sangue periferico materno, in particolare eritroblasti, monociti e linfociti, densità che sono sovrapponibili in condizioni fisiologiche.

Più specificamente il procedimento dell'invenzione porta ad una diminuzione della densità degli eritroblasti, e contemporaneamente aumenta la densità di monociti e linfociti.

La modifica dei parametri di densità permette un'efficiente separazione delle cellule attraverso una singola fase di centrifugazione in gradiente di densità discontinuo.

Al fine di ottenere questo risultato il sangue materno periferico viene trasferito da condizioni fisiologiche a condizioni non fisiologiche. Questa procedura rende gli eritroblasti più leggeri di 1,068 g/ml, mentre linfociti e monociti diventano più pesanti.

La ragione per cui la densità degli eritroblasti diminuisce mentre quella di linfociti e monociti aumenta non è compresa e costituisce una delle caratteristiche sorprendenti della presente invenzione.

Dopo aggiunta di un adatto aggregante eritrocitario quale, ad esempio Ficoll, gli eritroblasti vengono quindi isolati attraverso una singola centrifugazione in gradiente di densità discontinuo usando un adatto apparecchio separatore.

Il solo fatto di effettuare la centrifugazione in gradiente di densità in una singola fase diminuisce drammaticamente la perdita di materiale cellulare utile alla successiva analisi.

Come apparecchio separatore utile agli scopi della presente invenzione possono essere citati quelli descritti dal brevetto US 4.424.132 (a nome Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha) e dalle domande di brevetto GB 2 075 376 (a nome The Institut of Medical Sciences), FR 2 350 885 (a nome Baxter Travenol Laboratories, Inc.), WO 88/03045 (a nome North American Biologicals, Inc.), e MI97A002457 (a nome del richiedente). Tra questi apparecchi, risulta preferito quello descritto dalla domanda di brevetto MI97A002457, illustrato nella Fig. 1.

Dopo separazione, la frazione cellulare isolata contenente gli eritroblasti fetali e non e/o le cellule staminali, unitamente ad un percentuale molto inferiore di altre cellule, quali piastrine e, in quantità neglegibile, monociti, viene lavata e messa in mezzo di coltura ad ambientarsi. Dopo circa 24 ore vengono effettuati adatti test di rilevazione per individuare qualitativamente e quantitativamente le cellule fetali sulle quali si effettua l'analisi genetica.

Nel caso particolare degli eritroblasti fetali, oltre ai comuni esami morfologici, essi possono essere distinti da quelli adulti attraverso la ricerca delle catene  $\epsilon$  dell'emoglobina (emoglobina embrionaria). La catena  $\epsilon$  è peculiare degli eritroblasti sino alla 12<sup>a</sup>-14<sup>a</sup> settimana di gestazione, mentre è del tutto assente negli eritroblasti adulti che sono invece caratterizzati dalla catena  $\alpha$  e  $\beta$ .

Per quanto riguarda l'analisi genetica, si può utilizzare il test FISH (Fluorescent in situ hybridization) che viene diretto, ad esempio, all'individuazione del cromosoma Y, ovviamente assente nella madre, al fine di stabilire il sesso del nascituro. Un'alternativa consiste nel porre le cellule in



coltura ed effettuare il kariogramma, per cui oltre al numero di cromosomi si possono individuare eventuali alterazioni all'interno dei singoli cromosomi.

Come già detto sopra, il procedimento della presente invenzione consente di effettuare una diagnosi genetica dai molteplici vantaggi rispetto ai metodi dell'arte nota in quanto il metodo è rapido, semplice, economico, affidabile e non invasivo. Fornendo un rapporto rischi/benefici assolutamente a favore dei secondi, questo metodo rappresenta non solo uno strumento diagnostico d'elezione per le gestanti attempate o gravate da rischi di malattie genetiche ereditarie, ma anche un mezzo di indagine genetica attendibile e sicuro dal punto di vista sanitario per quelle donne che pur essendo al di fuori del gruppo prima descritto desiderano garanzie circa lo stato di salute del nascituro.

Una caratteristica di estremo valore del metodo diagnostico effettuabile con le cellule fetali isolate secondo il metodo della presente invenzione, è che tale metodo può essere effettuato prima della 14<sup>a</sup> settimana di gestazione, in particolare, a partire dalla 7<sup>a</sup> settimana di gestazione.

Verrà ora fornito un esempio di attuazione della presente invenzione.

#### ESEMPIO 1

Sangue materno periferico (20 ml), addizionato con eparina per prevenirne la coagulazione, è stato addizionato con un mezzo di coltura tissutale (25 ml) di avente la composizione illustrata nella Tabella 2.

Tabella 2

COMPONENTE	g/l
calcio cloruro diidrato	0,265

COMPONENTE	g/l
calcio cloruro diidrato	0,265
nitrato ferrico nonidrato	0,00072
magnesio solfato	0,09767
potassio cloruro	0,4
sodio acetato	0,05
sodio cloruro	6,8
sodio fosfato monobasico	0,122
DL-alanina	0,05
L-arginina cloridrato	0,07
acido DL-aspartico	0,06
L-cisteina cloridrato idrato	0,00011
L-cistina dicloridrato	0,026
acido DL-glutamico	0,1336
L-glutamina	0,1
glicina	0,05
L-istidina cloridrato idrato	0,02188
idrossi-L-prolina	0,01
DL-isoleucina	0,04
DL-leucina	0,12
L-lisina cloridrato	0,07
DL-metionina	0,03
DL-fenilalanina	0,05
L-prolina	0,04

COMPONENTE	g/l
calcio cloruro diidrato	0,265
DL-serina	0,05
DL-treonina	0,06
DL-triptofano	0,02
L-tirosina disodica diidrato	0,05766
DL-valina	0,05
acido ascorbico sale sodico	0,0000566
D-biotina	0,00001
calciferolo	0,0001
colina cloruro	0,0005
acido folico	0,00001
menadione sodio bisolfato	0,000016
mio-inositolo	0,00005
niacinamide	0,000025
acido nicotinico	0,000025
acido p-aminobenzoico	0,00005
acido D-pantotenico emicalcico	0,00001
piridossale cloridrato	0,000025
piridossina cloridrato	0,000025
retinolo acetato	0,00014
riboflavina	0,00001
DL- $\alpha$ -tocoferolo fosfato sodico	0,00001
tiamina cloridrato	0,00001

Quindi si sono aggiunti 5 ml di una soluzione acquosa contenente acido citrico monoidrato (2 g/250 ml), sodio citrato diidrato (5,5 g/250 ml) e destrosio monoidrato (6,125 g/250 ml), ottenendo in tal modo le seguenti condizioni non fisiologiche:

pH	6,65	
osmolarità	320	mOsm/l
Na <sup>+</sup>	165	mmol/l
K <sup>+</sup>	4,35	mmol/l
Cl <sup>-</sup>	110	mmol/l
Ca <sup>2+</sup>	1,20	mmol/l
glucosio	500	mg/dl
lattato	10	mg/dl

Il sangue periferico così diluito è stato trasferito in una bottiglia da coltura tissutale e lasciato per una notte a 4°C, per consentire alle cellule di creare un nuovo equilibrio ionico nelle nuove condizioni non fisiologiche cui sono sottoposte.

Il sangue periferico materno così trattato è stato introdotto nell'apparecchio separatore di Fig. 1 attraverso il dotto (2), seguito da 40 ml di una soluzione di Ficoll-sodio diatrizzato avente una densità di 1,068 g/ml ed un'osmolarità di 290 mOsm. Quest'ultima soluzione è stata preparata con Ficoll (agente aggregante eritrocitario) e sodio diatrizzato per ottenere la desiderata densità, sciolti in Tris-HCl e soluzione Tris-salina bilanciata. Tris-HCl è 0,175M a pH 7,4, mentre la Tris-salina bilanciata è composta da NaCl 125mM, KCl 5mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2mM, Tris 35mM e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM. In tal modo il sangue materno si trova tutto so-



pra il livello corrispondente alle aperture dei dotti (4), mentre al di sotto di questo livello si trova la soluzione di Ficoll/sodio diatrizioato.

Nell'apparecchio separatore cellulare così caricato si è quindi effettuata una centrifugazione a 400g per 1 ora usando uno schema a bassa accelerazione e decelerazione. La migrazione differenziale durante la centrifugazione ha dato luogo alla formazione di strati contenenti i diversi tipi di cellule. Lo strato inferiore contiene gli eritrociti aggregati dal Ficoll e che perciò sedimentano completamente attraverso il mezzo di separazione. Lo strato intermedio, sovrastante quello degli eritrociti, contiene quasi tutte le altre cellule ematiche che nelle presenti condizioni sperimentali raggiungono un livello di densità tale da migrare attraverso il mezzo di separazione verso il fondo dell'apparecchio. A causa della loro bassa densità, si trovano all'interfaccia tra plasma e mezzo di separazione i soli eritroblasti, insieme ad altre particelle a bassa velocità di sedimentazione (piastrine e pochi monociti).

Per raccogliere la frazione cellulare che galleggia sulla superficie del mezzo separatore a livello dell'uscita, cioè dei dotti (4), viene introdotto un liquido molto denso e non miscibile con acqua (Fluorinert®, 3M Company; densità 1,8 g/ml) alla base della camera allungata attraverso il dotto (2), mentre simultaneamente si pompa aria dalla sommità dell'apparecchio separatore attraverso il dotto (3), usando la medesima polpa peristaltica a due canali (velocità di flusso: 2 ml/min).

il risultato è che le cellule galleggianti all'interfaccia tra il plasma e il mezzo separatore sono forzate attraverso i dotti laterali (4), e vengono raccolte in pochi minuti.



Gli eritroblasti vengono contati con un contaglobuli. Viene effettuata una conta differenziale su citocentrifugati con colorazione con May-Grunwald Giemsa (MGG).

La soluzione è stata sottoposta alle seguenti analisi:

a) ricerca immunologica *in situ* dell'emoglobina embrionaria (catena  $\epsilon$ ): le sospensioni di eritroblasti sono stati centrifugate a 200g per 5 minuti; i citocentrifugati ottenuti sono state trattate con un anticorpo monoclonale specifico che la catena  $\epsilon$  dell'emoglobina per verificare la presenza di cellule fetali;

b) fluorescent in situ hybridization (FISH) per il cromosoma Y: gli stessi centrifugati del metodo a) sono state usate per ricercare i cromosomi del sesso attraverso un FISH che impiega la sonda specifica per il cromosoma Y digossigenata (Chromosome Y Cocktail DYZ3 DYZ1, Oncor Inc., Gaithersburg, MD) rilevata con il frammento Fab antidigossigenina coniugato con rodamina (Boehringer, Mannheim, Germania), e la sonda biotinilata specifica per il cromosoma X (Chromosome X a-Satellite, Oncor Inc., Gaithersburg, MD) rilevata con avidina coniugata con FITC; i nuclei sono stati contro-colorati con DAPI.

Gli eritroblasti fetali isolati si sono dimostrati eccezionalmente adatti all'analisi FISH: l'efficienza di ibridizzazione è stata del 90% con le sonde X e Y combinate. I risultati del FISH hanno sempre confermato il sesso di tutti i feti maschi (sesso determinato tramite ecografia o altro metodo).

L'efficienza con la quale gli eritroblasti fetali sono stati isolati dai 20 ml di sangue periferico materno viene illustrata nella successiva Tabella 3.

Tabella 3

Campione	Settimane di gestazione	Sesso del feto	Sesso FISH	N°. totale di cellule raccolte ( $\times 10^6$ )	N°. di cellule nucleate valutate con FISH	N. di cellule con segnali Y specifici	N. di cellule positive alla catena $\epsilon$ dell'emoglobina.
ALT	7 <sup>11</sup>	M	M	0,12	823	31	48
AUR	8 <sup>2</sup>	F	F	1,2	717	0	24
TRE	8 <sup>2</sup>	M	M	0,5	2.020	14	18
PIN	8 <sup>2</sup>	M	M	3,7	13.767	23	31
MAR	9	M	M	4	417	41	60
GIA	9	M	M	0,5	1.268	61	38
MON	9 <sup>3</sup>	M	M	0,75	2.172	82	71
SCA	10	F	F	0,6	1.538	0	24
BIZ	10 <sup>44</sup>	M	M	1	649	23	16
PES	10 <sup>6</sup>	F	F	1	1.466	0	18
GIO	11	M	M	0,5	2.154	37	27
SCO	14 <sup>2</sup>	M	M	0,75	336	23	29

## RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per isolare le cellule fetali presenti nel sangue materno periferico, comprendente le seguenti fasi:

a) il sangue periferico materno viene aggiunto ad un mezzo coltura tissutale non fisiologico;

b) vi si aggiunge una soluzione di acido citrico, sodio citrato e destrosio;

c) il sangue proveniente dalle fasi a) e b) viene introdotto in un adatto apparecchio separatore nel quale viene successivamente introdotta una soluzione di densità maggiore contenente un aggregante eritrocitario;

d) le cellule nucleate aventi una prestabilita densità vengono isolate tramite una singola centrifugazione in gradiente di densità discontinuo;

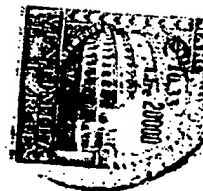
e) le cellule nucleate vengono lavate con un mezzo da coltura tissutale e risospese in mezzo di coltura appropriato;

f) le cellule fetali vengono individuate quantitativamente e qualitativamente tramite adatti sistemi di riconoscimento.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1 tramite il quale vengono isolati eritroblasti fetali.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 nel quale dopo la fase b) le condizioni non fisiologiche sono le seguenti:

pH	6,4-6,6	
osmolarità	300-330	mOsm/l
Na <sup>+</sup>	150-170	mmol/l
K <sup>+</sup>	4,5-5,5	mmol/l
Cl <sup>-</sup>	100-115	mmol/l
Ca <sup>2+</sup>	1,00-2,50	mmol/l



glucosio 400-500 mg/dl

lattato 10-20 mg/dl

4. Procedimento secondo la rivendicazione 3 nel quale dopo la fase

b) le condizioni non fisiologiche sono le seguenti:

pH 6,65

osmolarità 320 mOsm/l

Na<sup>+</sup> 165 mmol/l

K<sup>+</sup> 5,35 mmol/l

Cl<sup>-</sup> 110 mmol/l

Ca<sup>2+</sup> 1,20 mmol/l

glucosio 500 mg/dl

lattato 10 mg/dl

5. Procedimento secondo la rivendicazione 1 in cui l'agente eritrocitario aggiunto nella fase c) è Ficoll.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 1 in cui nella fase d) si preleva materiale corrispondente ad un valore di densità inferiore a 1,068.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 1 nel quale l'apparecchio separatore utilizzato nella fase c) è quello descritto nella Fig. 1.

8. Uso delle cellule embrionali isolate secondo il procedimento descritto dalla rivendicazione 1, per effettuare diagnosi genetiche.

9. Uso secondo la rivendicazione 8 secondo il quale la diagnosi genetica può essere effettuata prima della 14<sup>a</sup> settimana di gestazione.

10. Uso secondo la rivendicazione 8 secondo il quale la diagnosi genetica può essere effettuata a partire dalla 7<sup>a</sup> settimana di gestazione.

(ROS) *[Signature]*

*[Handwritten mark]*

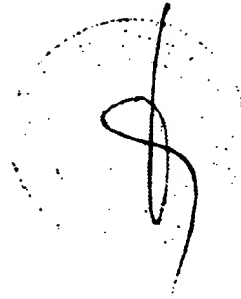
Milano, 30 Marzo 1999

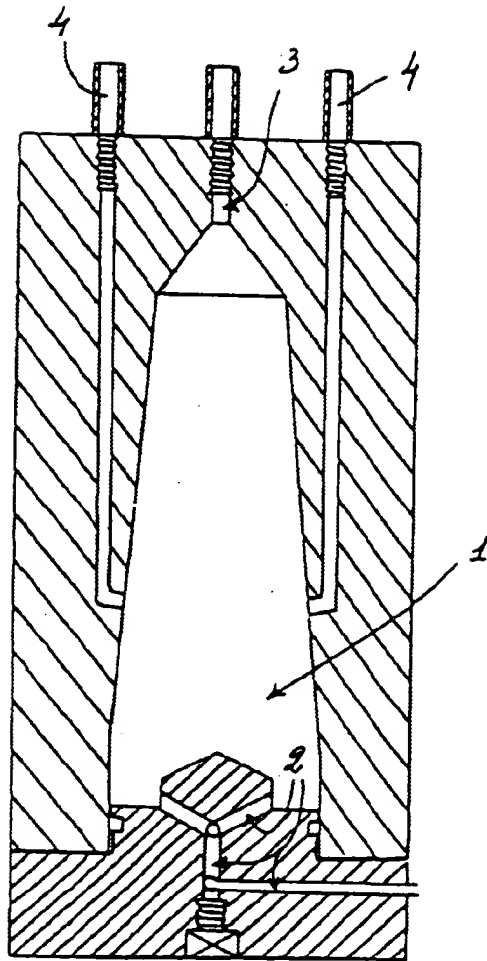
p. SITAR GIAMMARIA

il Mandatario

Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

A handwritten signature, likely of Dr. Diego Pallini, is written in black ink. The signature is enclosed within a faint, circular dotted stamp. The signature itself is a stylized, cursive 'D' followed by a vertical line and a loop.



MISSA 0001

Ros

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece		Republic of Macedonia	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon		Republic of Korea	PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

polymerase chain reaction (PCR). Following these studies by molecular biology techniques, the presence of fetal cells in maternal blood has been later confirmed and is now firmly established. Embryonic cells (before XII weeks of gestation) and fetal cells (after XII weeks of gestation) are collectively termed "fetal cells", in the international literature. Several procedures have been proposed in literature to isolate these few cells for non-invasive genetic investigation, but the final fetal cell yield is so low that it precludes reliable cytogenetic analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) or other genetic procedures due to an enormous maternal cell contamination.

The most favorable candidate cell type to be isolated for prenatal non-invasive genetic investigation is the nucleated red blood cell (NRBC), which is exceptionally rare in adult blood while in early fetal blood NRBCs are the most represented cell type together with stem cells.

Fetal white blood cells are present in extremely low percentage in fetal blood during the first trimester of pregnancy, it is therefore highly improbable to find them in maternal blood during the first trimester of pregnancy.

At least 20 fetal cells have to be isolated from maternal blood for reliable genetic investigation. According to the literature, few hundreds fetal cells are circulating in 25 ml maternal peripheral blood,

within  $150-200 \cdot 10^6$  maternal nucleated cells and  $100-150 \cdot 10^9$  RBCs.

This exceedingly low number of fetal cells within a large bulk of maternal cells represents the major obstacle to be overcome especially in view of the fact that a multi-step procedure produces a cellular loss along each step. The preferred method must therefore try to minimize cellular loss and obtain fetal cell isolation by a single-step procedure.

Standard cell separation methods to isolate fetal cells from maternal blood use a first step whereby fetal cells are enriched by density gradient centrifugation in standard centrifuge tubes followed by highly sophisticated technology as centrifugal elutriation, fluorescence activated cell sorting or charge flow separation.

Density gradient centrifugation in standard centrifuge tubes produces major cellular loss, at least 50% of cells initially present in the starting cell sample hit the tube walls where they stick or aggregate falling down to the tube bottom),



## CLAIMS

1. A method for isolating fetal cells present in maternal peripheral blood comprising the steps of:

- 5 a) transferring maternal blood into non-physiological tissue culture medium;
- b) an aqueous solution is added, containing citric acid, Na citrate and dextran;
- c) maternal blood, as modified in a) and b) is transferred into a cell separation device, followed by the introduction into the said separation device of a liquid having an higher density and containing a RBCs aggregating agent;
- 10 d) the nucleated cells, having a lower density than the liquid introduced in the step c) are isolated, in the discontinuous density gradient, by subjecting the separation device to centrifugal force;
- e) the isolated cells are washed and resuspended in tissue culture medium to regain physiological cell metabolism;
- 15 f) fetal cells are identified by appropriate procedures and counted.

2. The method of claim 1 whereby fetal NRBCs are isolated.

3. The method of claim 1 in which, after step b, the non-physiological medium is the following:

	pH	6.4 -6.6	
20	osmolality	300-330	mOsm
	Na <sup>+</sup>	150-170	mmol/l
	K <sup>+</sup>	4.5-5.5	mmol/l
	Cl <sup>-</sup>	100-115	mmol/l
	Ca <sup>++</sup>	1.00-2.50	mmol/l
25	glucose	400-500	mg/dl
	lactate	10-20	mg/d

4. The method of claim 3 in which the non-physiological medium is:

	pH	6.5	
	osmolality	320	mOsm
30	Na <sup>+</sup>	165	mmol/l
	K <sup>+</sup>	5.35	mmol/l
	Cl <sup>-</sup>	110	mmol/l

Ca <sup>++</sup>	1.25	mmol/l
glucose	500	mg/dl
lactate	10	mg/dl

- 5 5. The method of claim 1 in which the RBCs aggregating agent of step c) is Ficoll.
6. The method of claim 1 in which the density of the liquid introduced in the separation device by the step c) is 1.068 g/ml.
7. The method of claim 1. in which the separation device used in step c is that shown in Fig. 1.
- 10 8. Use of fetal cells isolated by the method of claim 1 for prenatal genetic investigation.
9. Use according to claim 8 whereby genetic investigation is carried out as early as the 14<sup>th</sup> week of gestation.
10. Use according to claim 8 whereby genetic investigation is carried out as early  
15 as he 8<sup>th</sup> week of gestation.